



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

Eficacia antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de propóleo sobre
cepas de *Staphylococcus aureus*

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO CIRUJANO**

AUTORA:

CABRERA ROJAS LIZBETH ALEXANDRA JENNETTE

ASESORES

MG. JAIME POLO GAMBOA

DR. SANTIAGO BENITES CASTILLO

DRA. AMALIA VEGA FERNÁNDEZ

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TROPICALES

TRUJILLO – PERÚ

2016

MG. JAIME POLO GAMBOA
PRESIDENTE

DR. MIGUEL IBAÑEZ RELUZ
SECRETARIO

DRA. AMALIA VEGA FERNÁNDEZ
VOCAL

DEDICATORIA

A Dios, por esta vida llena de bendiciones y dificultades que me han fortalecido para llegar hasta este punto, además de su infinita misericordia.

A mi madre, María Rojas Armas, por ser mi mejor amiga, cómplice y mi apoyo incondicional, por impulsar siempre en mí, el deseo de superación.

A mi padre, Lucio Cabrera Huaripata, por guiar mis pasos y mis acciones en el correcto camino de la vida e inculcarme el valor de la responsabilidad.

A mis hermanos Cristian y Carolina, por ser mis compañeros de alegrías y tristezas.

A mi tía Betty y primos Miguel, Valentina y Betita, por su cariño sincero y motivación permanente.

AGRADECIMIENTO

A mis asesores Mg. Jaime Polo Gamboa y Dr. Mblgo. Santiago Benites Castillo, por sus conocimientos y constante exigencia en la realización de este trabajo, además de su amistad y dedicación.

A la Dra. Amalia Vega Fernández y a la Prof. Lucía Bardales Aguirre, por su tiempo, experiencia y orientación en el desarrollo de la presente investigación.

A los maestros de la Escuela profesional de Medicina, tanto de áreas preclínicas como clínicas, por sus enseñanzas y consejos, que fortalecieron en mí, el amor hacia mi carrera.

A mi alma máter Universidad César Vallejo, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de ella.

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo Lizbeth Alexandra Jannette Cabrera Rojas con DNI N° 75096016, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Medicina, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

Así mismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, Diciembre del 2016

Lizbeth Alexandra Jannette Cabrera Rojas

DNI N° 75096016

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada “EFICACIA ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*”, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico cirujano.

La Autora

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iv
PRESENTACIÓN	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Realidad problemática.....	1
1.2. Trabajos previos	2
1.3. Teorías relacionadas al tema	4
1.4. Formulación del problema	7
1.5. Justificación del estudio.....	7
1.6. Hipótesis.....	8
1.7. Objetivos	8
II. MÉTODO.....	9
2.1. Diseño de investigación:.....	9
2.2. Variables, operacionalización:	9
2.3. Población y muestra:	11
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	13
2.5. Métodos de análisis de datos	16
2.6. Aspectos éticos	17
III. RESULTADOS	17
IV. DISCUSIÓN.....	23
V. CONCLUSIONES	25
VI. RECOMENDACIONES	25
VII. REFERENCIAS	26
VIII. ANEXOS	30

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la eficacia antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de propóleo (EEP) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, elaborando concentraciones al 60%, 70%, 80% y 90%, utilizando el método de Kirby Bauer y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el método de macrudilución empleando dos grupos control: Oxacilina e inóculo microbiano con agua destilada estéril, realizándose 24 repeticiones en cada caso. Con el método de análisis de varianza se obtuvo diferencia estadísticamente significativa del efecto antimicrobiano entre las diferentes concentraciones del EEP sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ($P < 0.05$), siendo eficaz el EEP al 80% y 90%; así como la oxacilina, no existiendo eficacia antimicrobiana en concentraciones de EEP al 60% y 70% por no tener halos de inhibición sensibles (< 21 mm). Por otro lado, los promedios de halo de inhibición EEP al 90%, 80%, 70% y 60% fue de $28,5 \pm 1,18$ mm ; $27,5 \pm 0,59$ mm; $17,1 \pm 1,21$ mm y $8,5 \pm 1,10$ mm, respectivamente. Así mismo, el halo de inhibición promedio de Oxacilina fue de $32,3 \pm 0,68$ mm., considerándose el mejor tratamiento por tener alta diferencia significativa comparado con las diferentes concentraciones de EEP. Por último, la CMI del EEP fue 546.9 ug/ml mientras que de Oxacilina fue 19.5 ug/ml. En conclusión, EEP tiene eficacia antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 80% y 90%.

Palabras clave: Propóleo, extracto etanólico, *Staphylococcus aureus*, efecto antimicrobiano, Kirby Bauer, concentración mínima inhibitoria.

ABSTRACT

This investigation's objective was to determine the in vitro antimicrobial effectiveness of Ethanolic extract of propolis (EEP) on *Staphylococcus aureus* strains, by the preparation of four EEP concentrations: 60%, 70%, 80% and 90%, using the Kirby Bauer method and the minimal inhibitory concentration (MIC) made by the macrodilution method. Likewise, there were used two control groups: Oxacilin and microbial inoculum with distilled water. There were used 24 repetitions in each case. By the variance analysis it was found statistics differentiation between the different EEP concentrations on *Staphylococcus aureus* strains ($P < 0.05$), considering it as effective in EEP concentrations at 80% and 90%, likewise Oxacilin. There was no antimicrobial effectiveness at EEP concentrations of 60% and 70% because their inhibition halos were not sensitive (< 21 mm). On the other hand, the inhibition halos average of the EEP concentrations of 90%, 80%, 70% and 60% were of $28,5 \pm 1,18$ mm ; $27,5 \pm 0,59$ mm ; $17,1 \pm 1,21$ mm and $8,5 \pm 1,10$ mm, respectively. In this respect, Oxacilin had an inhibition halo average of $32,3 \pm 0,68$ mm, being considered the best treatment because it had the best significance difference compared with the different EEP concentrations. By last, the EEP' MIC was 546.9 ug/ml and the MIC of Oxacilin was of 19.5 ug/ml, concluding that the EEP has antimicrobial effectiveness on *Staphylococcus aureus* strains at concentrations of 80% and 90%.

Key words: Propolis, ethanolic extract, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial effectiveness, Kirby Bauer, MIC.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Realidad problemática

El único sistema guardián de antiguas generaciones durante muchos siglos, ha sido la medicina tradicional, la cual formaba parte de la cultura de los pueblos, siendo utilizada en casi un 80% de la población para la resolución de sus principales necesidades de salud, según el cálculo de la Organización mundial de la salud (OMS)¹.

En países en vías de desarrollo, la medicina natural se encuentra como una necesidad primaria en los sistemas de salud y en su estructura económica, ya que al considerarse países pobres, no pueden costear el elevado gasto farmacéutico de las prescripciones médicas y tampoco disponen de una industria farmacéutica potente¹.

Los extractos vegetales constituyen elementos importantes en el ámbito de la salud, ya que a partir de ellos se pueden dar usos terapéuticos en distintas patologías médicas. Estos extractos son obtenidos mediante el procesamiento de productos vegetales asociados a solventes adecuados tales como etanol, agua o éter a partir de elementos solubles compuestos por una combinación de principios activos y sustancias inertes producidos por la totalidad o partes de una planta fresca o seca².

En la práctica clínica diaria encontramos distintas infecciones dentro de las cuales el patógeno más virulento es *Staphylococcus aureus*, el cual ha demostrado su gran volubilidad al constituirse como importante causa de morbilidad y mortalidad intra y extrahospitalaria debido a su pluripotencialidad causante de dolencias a través de mecanismos que puede involucrar o no la acción de toxinas; variando la severidad de las afecciones que pueden partir desde procesos relativamente menores de la piel y partes blandas, hasta producir trastornos de carácter generalizado de gran letalidad³.

Se pueden identificar diversos casos de enfermedades dermatológicas que varían según la situación geográfica y están influenciadas por factores étnicos y ambientales, siendo consideradas dentro de las prioridades del control de

enfermedades en países en desarrollo por el banco mundial, ya que los niños en particular al ser un grupo vulnerable, tienden a ser los más afectados; y porque la morbilidad es significativa debido a la desfiguración, discapacidad o síntomas como prurito intratable que reducen la calidad de vida y conducen al aislamiento social, significando pérdidas económicas para el país⁴. En el Perú, según el ministerio de salud, estas infecciones se encuentran entre los 10 primeros motivos de morbilidad de consulta externa en niños entre 1 a 4 años de edad hacia el mes de junio del 2015^{5,6}.

Ante ello, una alternativa al tratamiento habitual con penicilinas antiestafilocócicas como la oxacilina³, es el uso del propóleo, ya que posee acción bacteriostática y bactericida debido a los flavonoides llamados galangina y pinocembrina, así como también los compuestos derivados de ácidos cafeico, ferúlico y benzoicos; que le confieren un efecto antibacteriano sobre gérmenes grampositivos como el estafilococo dorado^{7,8}.

1.2. Trabajos previos

Popova M. et al.⁹ (Bulgaria, 2013) obtuvieron perfiles químicos de extractos de propóleo Omaní mediante análisis GC-MS después de sililación. Más de 50 compuestos individuales fueron identificados en las muestras pertenecientes a distintos tipos de compuestos: azúcares, polioles, ácidos hiróxicos, ácidos grasos y cardols, derivados flavonoides, triterpenos y chalcones. El extracto etanólico de las muestras estudiadas de propóleo demostraron actividad contra *Staphylococcus aureus* con una concentración mínima inhibitoria < 100 ug mL⁻¹. Hubo una correlación significativa ($r = 0,9646$; $p < 0,01$) entre la CMI de *St. aureus* y *E. coli*.

Da Cunha M. et al.¹⁰ (Brasil, 2013), examinaron la actividad antimicrobiana de extracto etanólico de geoprópolis (EEGP: un tipo de propóleo que contiene resina, cera, recogido por especies de abejas sin aguijón en zonas tropicales) y determinaron su concentración mínima bactericida así como su concentración mínima inhibitoria contra seis cepas de bacterias. Se encontró que el EEGP inhibió significativamente el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* en concentraciones menores, y su fracción hexano (FH) presentó la mayor actividad

antibacteriana. Ambos, el extracto etanólico de propóleo y la fracción hexano inhibieron la adherencia de biofilm ($p < 0.05$). La CMI de EEP fue de 6,25 – 12,5 ug/ml y su CMB fue de 25 – 50 ug/ml.

Monzote L. et al.¹¹ (Brasil, 2012) investigaron el efecto de 20 extractos de propóleo de distintas regiones de Cuba, contra bacterias (*E. coli*, *St. aureus*), hongos (*Tricophyton rubrum* y *Cándida albicans*) y protozoos (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania infantum*). *St. aureus* y *E. coli* fueron cultivados a 37°C en medio Muller – Hinton obteniendo resultados que mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus* en concentraciones (ug/ml) bajas, de parte del extracto de propóleo. Una asociación estadística significativa ($p = 0,029$) fue demostrada para la actividad de extracto de propóleo cubano amarillo.

Carrillo M. et al.¹² (México, 2011) estimaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y acuosos de propóleo los cuales fueron recolectados en México: Huasteca Potosina. En este estudio se usó cepas de microorganismos Gram negativos y Gram positivos incluyendo *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *S. agalactiae*; realizándose la comparación de resultados mediante análisis de regresión múltiples ($p \leq 0,05$). Se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) de cada extracto a través del método de dilución en tubo, siendo de 0,93 mg mL⁻¹ para las bacterias Gram positivas y 7,5 mg mL⁻¹ para las gram negativas. Se concluyó que los extractos etanólicos del propóleo, a comparación de los extractos acuosos, tienen una mayor actividad antibacteriana significativa, la cual depende de factores como su procedencia y la especie bacteriana adecuada.

Alves E. et al.¹³ (Colombia, 2011) caracterizaron especímenes de propóleo de *Apis mellifera* de la región andina colombiana según dos perfiles: fisicoquímico y antimicrobiano. Emplearon extractos etanólicos de propóleo mediante la técnica de disco – difusión frente a especies de *E. coli*, *St. aureus* y *Cándida albicans*. Se calculó el porcentaje del contenido de cera, el extracto seco, el índice de oxidación y la determinación cuantitativa de compuestos flavonoides y fenólicos para su caracterización fisicoquímica, presentando actividad antibacteriana en todas las muestras trabajadas, las cuales mostraron halos de inhibición que varían entre 8 y

12 mm. Para *E. coli* y entre 8,3 y 23,5 mm para *S. aureus*. En conclusión, hubo actividad antimicrobiana significativa contra *S. aureus*. y *E. coli* en los propóleos de la región andina colombiana; sin embargo no se detectó ninguna actividad frente a *C. albicans*. Se encontró un nivel de significancia de 5% ($p < 0.05$).

1.3. Teorías relacionadas al tema

Los estafilococos son bacterias esféricas grampositivas que suelen estar distribuidas en grupos irregulares a manera de racimo de uvas. Crecen con sencillez en distintos medios siendo metabólicamente activos, pero fermentan los carbohidratos produciendo pigmentos cuyo color puede ser blanco e incluso volverse amarillo intenso. Determinadas cepas constituyen parte de la flora saprofita de la piel y de las mucosas del hombre; mientras que otras producen alteraciones como formación de abscesos entre otras infecciones piógenas que incluyen septicemia mortal. El mecanismo de acción de los estafilococos patógenos es a través de la hemólisis, coagulación del plasma y producción de diversas enzimas y toxinas extracelulares, siendo un tipo común de envenenamiento alimentario el provocado por la enterotoxina estafilocócica termoestable. Además estos gérmenes desarrollan resistencia a muchos agentes antimicrobianos con rapidez, planteando problemas terapéuticos difíciles.¹⁴

Al menos 20 especies pueden hallarse en el género *Staphylococcus*; siendo *Staphylococcus aureus* un microorganismo positivo a la coagulasa y patógeno de gran importancia para el ser humano, causante de muchas infecciones graves. En su composición incluye proteínas antigénicas y polisacáridos, así como otras sustancias importantes de la estructura de la pared celular, como el peptidoglucano, el cual es un polímero polisacárido que contiene subunidades enlazadas capaz de ser destruido por ácidos fuertes y la exposición a la lisozima. Esto es de relevancia en la patogenia de las infecciones debido a que desencadena la fabricación de interleucina -1 y anticuerpos opsonicos en los monocitos; teniendo actividad de tipo endotoxínico al actuar como agente quimioatrayente de los leucocitos polimorfonucleares, lo cual activa el complemento¹⁴.

Este agente puede producir enfermedad por su capacidad para multiplicarse y extenderse con amplitud por los tejidos, así como por su producción de muchas sustancias extracelulares, de las cuales la mayoría son enzimas y otras se consideran toxinas, encontrándose bajo el control genético de los plásmidos; pudiendo producir catalasa que convierte al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, y producen coagulasa, que coagula el plasma oxalatado o citratado. Otras enzimas producidas incluyen la hialuronidasa, estafilocinasa que conlleva a la fibrinólisis, proteinasas, lipasas y beta lactamasas; así como también toxinas exfoliativas, toxina de síndrome de choque séptico y enterotoxinas¹⁵.

S. aureus provoca enfermedad través de invasión directa y destrucción del tejido como también por la producción de toxinas, debiéndose las manifestaciones clínicas casi exclusivamente a la actividad de estas últimas, como por ejemplo en el síndrome de piel escaldada por estafilococos, intoxicación alimentaria y síndrome de shock tóxico. Además, otras manifestaciones clínicas se producen a consecuencia de la multiplicación de los microorganismos, dando lugar a la formación de abscesos y destrucción tisular observado en infecciones cutáneas, neumonía, empiema, endocarditis, osteomielitis y artritis séptica¹⁵.

El propóleo se constituye como una agrupación de sustancias con apariencia resinosa y adherente cuya recolección se da a partir de yemas y cortezas de los árboles, por las abejas¹⁶. Es una sustancia viscosa de color anaranjado - rojiza, que recubre algunas yemas de árboles y resinas de coníferas.¹⁷ Su nombre proviene del vocablo griego "*Própolis*", que significa "puerta de una ciudad"¹⁸, en referencia a la colmena.

Su origen es principalmente vegetal, pues se trata de resinas o gomas viscosas e impermeables al agua que las pecoreadoras van a recolectar en las yemas de árboles como el álamo, las resinosas, los abedules, castaños y otros árboles; siendo utilizado por las abejas que lo recolectan y cubren con él el interior de su nido con el fin de reforzarlo y calorifugarlo, optimizando así la regulación del microclima de la colmena; utilizando para su transporte al nido, sus cestillos, como para el polen¹⁹.

La cantidad recolectada varía de una raza a otra y de una colonia a otra. Una colmena puede producir hasta 300 g. (más razonablemente 50 g.) por año de propóleo. Las abejas de raza caucasiana utilizan mucho más el propóleo que las otras razas de Europa del este.¹⁹

El propóleo bruto proviene de una mezcla de sustancia resinosa recogida de los vegetales, de cera (30%), de sustancias procedentes de regurgitaciones glandulares segregadas por las abejas y del polen. Separado de la cera, el propóleo contiene carburos de hidrógeno, lípidos, alcoholes, aldehídos y ácidos, sustancias flavonoides como la crisina (1-3 dioxiflavona) y galangina, pinocembrina, quetonas, vitaminas, cumarinas y terpenoides.¹⁹

Sus propiedades varían según el origen botánico y geográfico, destacando entre las propiedades medicinales del propóleo su poder antiinflamatorio y anestésico, así como su actividad antiviral, bacteriostática y bactericida, estas dos últimas debidas a la galangina y pinocembrina. Todas estas propiedades permiten al propóleo, bajo forma de ungüento o extracto etanólico, acelerar la cicatrización de heridas y quemaduras, cuidar las afecciones de la piel, hacer desaparecer verrugas, sabañones, eczemas, etc.¹⁹

Posee una variedad de nutrientes entre los que se encuentran aminoácidos, proteínas, vitaminas A, E y C, todas las vitaminas del complejo B, así como minerales; siendo un antibiótico natural por su poder bactericida; capaz de bloquear la enzima que causa el dolor y la fiebre, considerándose una aspirina natural. Así mismo, ayuda a regular la producción de histamina y serotonina, creando una especie de autoinmunidad, y se usa en caso de úlceras, herpes, infecciones, para la limpieza sanguínea, desórdenes gastrointestinales y aplicado externamente para aliviar heridas, quemaduras y várices por su poder cicatrizante.¹⁶

Lo utilizan las abejas como compuesto para cerrar las colmenas. Es considerado como un gran aliado de la medicina, alcanzando la importancia de la penicilina. Esta

importancia es debido a su amplio espectro contra gérmenes grampositivos como gramnegativos, encontrándose entre los primeros a *Staphylococcus aureus*.¹⁶

1.4. Formulación del problema

¿El extracto etanólico de propóleo tiene eficacia antimicrobiana in vitro sobre cepas de *Staphylococcus aureus*?

1.5. Justificación del estudio

A nivel local no se encontró antecedentes de investigaciones similares que hayan pretendido obtener y procesar el extracto etanólico de propóleo a diferentes concentraciones usando oxacilina como control positivo, y comprobar su eficacia antimicrobiana in vitro frente a *Staphylococcus aureus*.

Debido a que la región andina posee una diversidad de climas y una naturaleza libre de industrias y de tratamientos con pesticidas, permite un buen aprovechamiento de los recursos naturales, especialmente de los apifármacos como el propóleo, lo cual es de relevancia social en la ejecución de este proyecto, ya que la utilización de medicina natural ha incrementado considerablemente en los últimos tiempos¹⁸.

Además, al interés personal de la investigadora se suma la disposición de unidades de estudio, recursos humanos, recursos financieros, tiempo, asesoría y disponibilidad de un diseño para realizar la investigación, que hacen factible la realización de este trabajo, el cual pretende aportar bases científicas para su uso como terapia alternativa en el manejo de enfermedades infecciosas producidas por *staphylococcus aureus*, y, de encontrar resultados satisfactorios, se puedan realizar futuros estudios in vivo.

1.6. Hipótesis

H1: El extracto etanólico de propóleo tiene eficacia antimicrobiana in vitro sobre cepas de *Staphylococcus aureus*

H2: El extracto etanólico de propóleo no tiene eficacia antimicrobiana in vitro sobre cepas de *Staphylococcus aureus*

1.7. Objetivos

1.7.1. General

- Determinar la eficacia antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

1.7.2. Específicos

- Valorar el crecimiento bacteriano de cepas de *Staphylococcus aureus* frente al extracto etanólico de propóleo a diferentes concentraciones (60%, 70%, 80%, 90%) por el método de Kirby y Bauer.
- Comparar la eficacia antimicrobiana entre cada concentración del extracto etanólico de propóleo contra oxacilina, medidos a través del halo de inhibición
- Identificar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo a diferentes concentraciones, sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Identificar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la oxacilina, sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

II. MÉTODO

2.1. Diseño de investigación:

Experimental puro con comparaciones múltiples, diseñada con post prueba únicamente y grupo de control.

RG₁:	X ₁	-	O ₁
RG₂:	X ₂	-	O ₂
RG₃:	X ₃	-	O ₃
RG₄:	X ₄	-	O ₄
<hr/>			
RG_i:	X _i		O _i
RG_{i+1}:	X _{i+1}		O _{i+1}

Donde:

R: Asignación al azar

G: Placas petri con *Staphylococcus aureus*

X₁₋₄: Tratamiento con extracto etanólico de propóleo a concentraciones (60%, 70%, 80%, 90%)

X_i: Tratamiento con control positivo: oxacilina

X_{i+1}: Tratamiento con control negativo: agua destilada estéril

O₁₋₄: Observación post tratamiento con extracto etanólico a diferentes concentraciones (60%, 70%, 80%, 90%)

O_i: Observación post tratamiento con oxacilina

O_{i+1}: Observación post tratamiento con agua destilada estéril

2.2. Variables, operacionalización:

Variable independiente:

- Extracto etanólico de propóleo

Variable dependiente:

- Eficacia antimicrobiana

Variable	Definición Conceptual	Dimensión	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición
Extracto etanólico de propóleo	Extracto obtenido a partir de propóleo en bruto, por maceración en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico ²⁰ .	Extracto etanólico Propóleo	Se hará la medición mediante la Ficha de observación, teniendo en cuenta la concentración del extracto etanólico de propóleo.	<ul style="list-style-type: none"> • 60 % • 70 % • 80 % • 90 % 	Cuantitativa de razón
Eficacia antimicrobiana	Interferencia en el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos mediante una interacción específica con alguno de sus componentes celulares ²¹ .	Prueba de disco de difusión	Medición del diámetro del halo de inhibición de los discos en la prueba de difusión de disco, según el estándar M02 – A11 y M100 – S25 del CLSI ²² . Será eficaz cuando sea sensible.	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible (≥ 22 mm) • Intermedio (-) • Resistente (≤ 21 mm) 	Cualitativa ordinal
		Concentración mínima inhibitoria	Observación del crecimiento bacteriano en la prueba de macro dilución en tubo, según el estándar M07 – A9 del CLSI ²² . Será eficaz cuando haya ausencia de crecimiento.	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia • Ausencia 	Cualitativa nominal

2.3. Población y muestra:

2.3.1. Población: Cepas de *Staphylococcus aureus*, obtenidas de la Universidad Nacional de Trujillo – Laboratorio de bacteriología.

2.3.1.1. Unidad de análisis: Cada uno de los discos de difusión de *Staphylococcus aureus* observados.

2.3.1.2. Unidad muestral: Cada repetición realizada (con diferentes concentraciones del extracto etanólico de propóleo) en cada placa petri.

2.3.2. Muestra

2.3.2.1. Tamaño de muestra:

A través de la siguiente fórmula se obtuvo el número de ensayos a realizar:

$$n = \frac{2 (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S^2}{E^2}$$

Donde:

n = Número de repeticiones a efectuar en cada investigación

Z_{α} = 2.576 (Nivel de confianza: 99%)

Z_{β} = 0.842 (Potencia estadística del 80%)

S^2 = 0.90 (Varianza según muestra piloto)

$E = \overline{X}_1 - \overline{X}_2 = 21 - 21.7 = - 0.7$ (Error)

Calculando la muestra, se obtiene un mínimo de 22 repeticiones, sin embargo para efectos de la presente investigación se consideró $n = 24$ y como se tiene 4 diluciones, obtendremos 96 muestras en total.

Para efectos de este trabajo se tomarán 6 grupos para la evaluación:

- **RG₁**: 24 repeticiones en placas petri con siembra de *Staphylococcus aureus*, utilizando extracto etanólico de propóleo al 60%
- **RG₂**: 24 repeticiones en placas petri con siembra de *Staphylococcus aureus*, utilizando extracto etanólico de propóleo al 70%
- **RG₃**: 24 repeticiones en placas petri con siembra de *Staphylococcus aureus*, utilizando extracto etanólico de propóleo al 80%
- **RG₄**: 24 repeticiones en placas petri con siembra de *Staphylococcus aureus*, utilizando extracto etanólico de propóleo al 90%
- **RG_i**: 24 repeticiones en placas petri con siembra de *Staphylococcus aureus*, utilizando Oxacilina 1 g.
- **RG_{i+1}**: 24 repeticiones en placas petri con siembra de *Staphylococcus aureus*, utilizando agua destilada estéril.

Criterios de selección

Criterios de inclusión:

- Bacterias aerobias facultativas grampositivas: *Staphylococcus aureus*
- Bacterias que no hayan sido expuestas a alguna solución antimicrobiana o medicamento.

Criterios de exclusión:

- Siembras con manipulación inadecuada
- Cepas no reproducibles en medio de cultivo.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

2.4.1. Técnicas: Se observaron los cultivos de las cepas de *Staphylococcus aureus* en los que se añadieron soluciones a distintas concentraciones de extracto etanólico de propóleo, luego se midió el halo de inhibición en milímetros y se calculó la concentración mínima inhibitoria según el método de macrodilución en tubos.

2.4.2. Procedimiento:

2.4.2.1. Preparación del extracto etanólico de propóleo

Se empleó propóleo obtenido del distrito de Huari, ciudad de Huaraz, región Áncash.

La muestra obtenida se lavó con agua corriente, dejándola secar a temperatura ambiente para luego ser cortada a fin de obtener partículas uniformes una vez que ésta se encontrara seca, facilitando el proceso de elaboración del extracto etanólico; posteriormente se pesó para conocer la cantidad exacta a extraer.

La preparación de los extractos etanólicos se realizó utilizando el método de Carrillo M.¹² con algunos cambios. Se pesó 8 gramos de propóleo, envolviéndolos en papel filtro Whatman N° 40 y se colocó en el cuerpo intermedio del equipo Soxhlet, que es la parte donde se lleva a cabo la extracción, mientras que en el matraz balón del mismo equipo se colocó 200 ml de etanol al 96% y se sometió a reflujo durante 1 h y media, realizando el procedimiento por triplicado. El extracto final se transfirió al matraz de un rotavapor marca Buchi y se mantuvo en evaporación hasta observar desaparición del solvente. En este caso, la temperatura que se usó en el rotavapor fue de 70° a 77 rpm, haciendo más rápida la recuperación del solvente. El sólido obtenido se secó durante 2 horas en estufa a 80 °C, para eliminar residuos del solvente y obtener el extracto final.

Para obtener el rendimiento se utilizó la siguiente ecuación:

Rendimiento (%) = $P \cdot 100 / m$; donde P es el peso de extracto seco (g) y m es el peso de muestra (g).

Después de ello, el extracto seco obtenido fue pesado, utilizando este resultado para la preparación de las concentraciones al 60%, 70%, 80% y 90% en alcohol de 96%.

2.4.2.2. Preparación de la cepa de *Staphylococcus aureus*

Las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) fueron obtenidas del laboratorio de bacteriología de la Universidad Nacional de Trujillo.

Una vez obtenida la cepa se cultivó en tubos de ensayo en medio agar soya tripticasa (TCA) durante 48 horas a 37 °C, luego se diluyeron hasta conseguir turbidez del tubo en 0,5 de acuerdo a la escala de Mac Farland.²³

Se sembró la cepa en placas Petri conteniendo agar Mueller Hinton, utilizando un hisopo estéril embebido en el tubo del cultivo preparado, realizando el procedimiento a una distancia de 10 cm de la flama de un mechero, se hisopó uniformemente la superficie del agar en su totalidad, realizando giros de cada placa 30° por aproximadamente 10 veces.²⁴

2.4.2.3. Prueba de actividad bacteriana mediante método de Kirby - Bauer

Después del sembrado en placas Petri de las cepas de *Staphylococcus aureus* se elaboró la prueba de susceptibilidad a través del método de difusión de discos (Kirby Bauer) tras previa preparación de discos de papel filtro estéril con diámetro de 6mm, utilizando la micropipeta para embeberlos con 10 µL de cada una de las concentraciones de extracto etanólico de propóleo (60%, 70%, 80%, 90%). Posterior a ello, con la ayuda de una pinza de disección estéril se colocó cada disco sobre los cultivos de *Staphylococcus aureus* en placas Petri, que estuvieron preparados con anterioridad. Se emplearon dos grupos control, uno con oxacilina y el otro con agua destilada estéril. En seguida, las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.²⁴

A las 24 horas se llevó a cabo la lectura de los halos de inhibición de cada placa Petri conteniendo extracto etanólico de propóleo a distintas concentraciones. Se midió cada una de las concentraciones incluyendo el área del disco de papel de filtro con una regla milimetrada procediéndose de igual manera con ambos controles, interpretando los resultados según el estándar M02 – A11 y M100 – S25 del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (Clinical and laboratory standards institute – CLSI): ²²

- Sensible (≥ 22 mm)
- Intermedio (-)
- Resistente (≤ 21 mm)

Finalmente los valores obtenidos se compararon con los controles (Oxacilina y agua destilada estéril), correspondiendo mayor efecto bactericida a los que mostraron mayor diámetro en los halos de inhibición medidos y fueron cuantificados mediante la escala mencionada anteriormente.

2.4.2.4. Determinación de concentración mínima inhibitoria mediante método de macrodilución

Cumpliendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo realizando diluciones seriadas (1/6), en las que se utilizó el solvente twin 80 aplicando entre 500-0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de extracto etanólico del propóleo de Huaraz en cada una de ellas.²⁵

Se colocaron en 4 grupos de 6 tubos de ensayo cada uno, diluciones seriadas de 0,8 ml de solución salina con propóleo al 60%, 70%, 80%, 90% respectivamente. A cada uno de los tubos de ensayo del primer grupo se le agregó 0.2 ml de suspensión bacteriana de *S. aureus*, a temperatura ambiente. Para el control negativo se utilizó solo el cultivo bacteriano sin agregar propóleo. Todos los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas.

Luego de ello se determinó las cuentas viables (UFC) sembrando 0.1ml de solución de cada uno de los tubos en placas Petri con agar Mueller Hinton utilizando el asa Driglasky para dispersar la muestra; dichas placas se colocaron en estufa por 24

horas a 37°C y luego se observó el crecimiento bacteriano mediante el conteo de unidades formadoras de colonias considerándose como CMI a la menor concentración en la cual no se observaron UFC. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10cm de la llama de un mechero.

2.4.2.5. Recolección de datos: Se hicieron las mediciones de los halos con una regla, sobre la superficie de la placa Petri y con luz refleja, registrando los datos obtenidos en dos Fichas (ANEXO – 01, 02), que contuvieron datos acerca de la efectividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* y la sustancia química utilizada.

2.5. Métodos de análisis de datos

Los datos obtenidos se procesaron en una laptop Lenovo G50 CORE i3, empleando los siguientes Software: Procesador de Windows office 2013 y programa estadístico SPSS 23.0. El análisis de la información se realizó mediante el análisis de varianza para demostrar si existe significativa diferencia entre los promedios de la concentraciones en cuanto a su halo de inhibición, considerándose significativo cuando $p < 0,05$.

También se realizó el análisis de homogeneidad de varianza ($p < 0,05$) a partir del cual al no ser homogéneas se utiliza una medida no paramétrica como la prueba T3 de dunnet en la que se compara cada par de tratamientos indicando cual de ellos tiene mejor promedio, considerándose significativamente diferente cuando $p < 0,05$.

Por último se utilizó el análisis descriptivo a través de la realización de cuadros, gráficos y promedios obtenidos.

2.6. Aspectos éticos

La presente investigación contó con la autorización de la Facultad de Ciencias Médicas, escuela de Medicina de la Universidad César Vallejo, siguiendo las normas de bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos, elaborado por el Ministerio de Salud del Perú ²⁷.

III. RESULTADOS

Tabla N° 01: Eficacia antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de propóleo (EEP) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

TRATAMIENTO	EFICACIA ANTIMICROBIANA			
	SI		NO	
	Nº de repeticiones	%	Nº de repeticiones	%
EEP al 90%	24	100.0%	0	0.0%
EEP al 80%	24	100.0%	0	0.0%
EEP al 70%	0	0.0%	24	100.0%
EEP al 60%	0	0.0%	24	100.0%
TOTAL	48		48	

Fuente: Anexo N° 04

En la tabla N° 01 se observa que las 24 repeticiones realizadas de extracto etanólico de propóleo al 90% tuvieron eficacia de 100%, así como las 24 repeticiones del EEP al 80%.

Se observa también que todas las repeticiones del EEP al 70% y 60% no fueron eficaces.

Tabla N° 02: Valoración del crecimiento bacteriano de cepas de *Staphylococcus aureus* frente al extracto etanólico de propóleo (EEP) a diferentes concentraciones y oxacilina por el método de Kirby y Bauer.

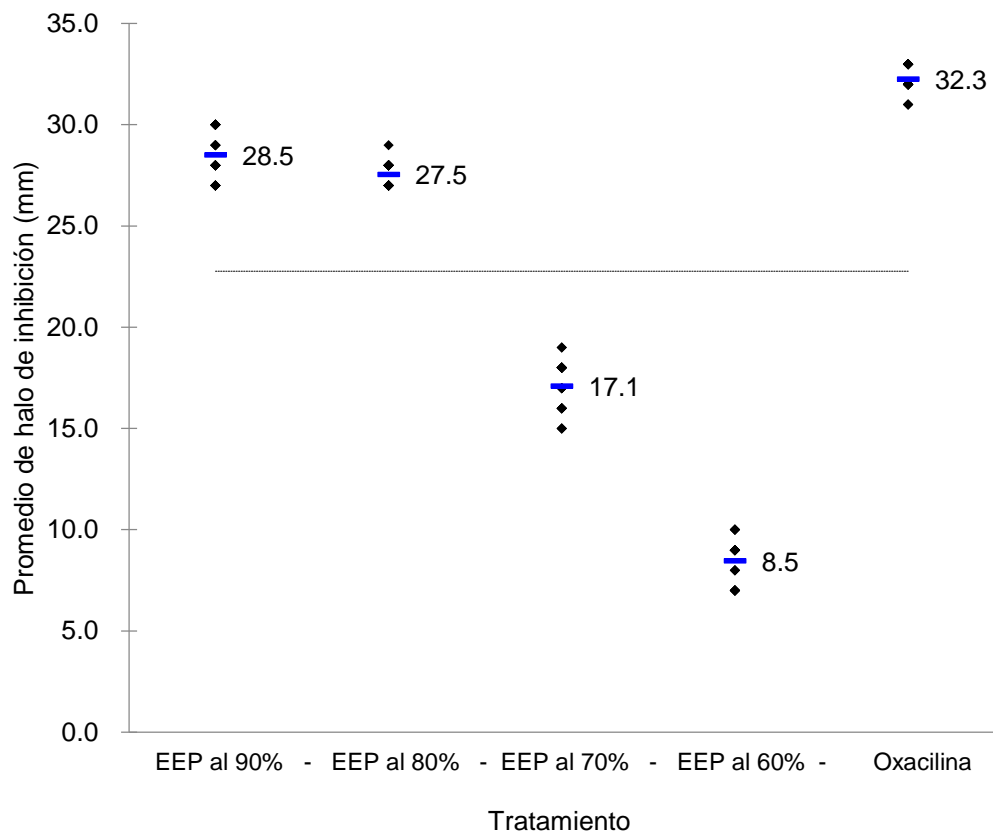
Tratamiento	N° de repeticiones	Halo de inhibición promedio	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Min	Max
					Límite inferior	Límite superior		
EEP al 90%	24	28.5	1.18	0.24	28.0	29.0	27	30
EEP al 80%	24	27.5	0.59	0.12	27.3	27.8	27	29
EEP al 70%	24	17.1	1.21	0.25	16.6	17.6	15	19
EEP al 60%	24	8.5	1.10	0.23	8.0	8.9	7	10
Oxacilina	24	32.3	0.68	0.14	32.0	32.5	31	33

Fuente: Anexo N° 04

En la tabla n° 02 se observa que el EEP al 90% presenta un promedio de halo de inhibición de $28,5 \pm 1,18$ mm, y el EEP al 80% tiene un promedio de $27,5 \pm 0,59$ mm; mientras que el EEP al 70% y 60% muestran promedios de halos de inhibición de $17,1 \pm 1,21$ mm y $8,5 \pm 1,10$ mm, respectivamente.

La oxacilina tuvo un halo de inhibición promedio de $32,3 \pm 0,68$ mm.

GRÁFICO Nº 01: Comparación de la eficacia antimicrobiana entre el extracto etanólico de propóleo (EEP) y oxacilina medidos a través del halo de inhibición



Fuente: Tabla Nº 02

Tabla N° 03: Comparación de la eficacia antimicrobiana entre cada concentración del extracto etanólico de propóleo (EEP) contra oxacilina, medidos a través del halo de inhibición.

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
EEP al 90%	EEP al 80%	0,95833*	0.27	0.011	0.16	1.76
EEP al 90%	EEP al 70%	11,41667*	0.35	0.000	10.40	12.43
EEP al 90%	EEP al 60%	20,04167*	0.33	0.000	19.08	21.01
EEP al 90%	Oxacilina	-3,75000*	0.28	0.000	-4.57	-2.93
EEP al 80%	EEP al 70%	10,45833*	0.28	0.000	9.64	11.28
EEP al 80%	EEP al 60%	19,08333*	0.26	0.000	18.32	19.84
EEP al 80%	Oxacilina	-4,70833*	0.18	0.000	-5.24	-4.17
EEP al 70%	EEP al 60%	8,62500*	0.33	0.000	7.64	9.61
EEP al 70%	Oxacilina	-15,16667*	0.28	0.000	-16.01	-14.33
EEP al 60%	Oxacilina	-23,79167*	0.26	0.000	-24.57	-23.01

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Fuente: Anexo N° 04

En la tabla N° 03 se observa que al comparar cada una de las concentraciones entre todas las posibles combinaciones se halla diferencia significativa entre los tratamientos, observándose que la Oxacilina es el mejor tratamiento y que las concentraciones de extracto etanólico de propóleo al 90% y 80% también tuvieron mayor diferencia significativa.

TABLA N° 05: Concentración mínima inhibitoria (ug/ml) del extracto etanólico de propóleo (EEP) frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

CMI	Crecimiento bacteriano	% crecimiento bacteriano
10000	0	0%
5000	0	0%
2500	0	0%
1250	0	0%
625	0	0%
312.5	9	75%
156.25	12	100%
78.125	12	100%
39.0625	12	100%
19.53125	12	100%

CMI EEP = 546.9 µg/mL

Fuente: Anexo N° 05

En la tabla N° 05 se observa que las cepas de *Staphylococcus aureus* comienzan a crecer en el extracto etanólico de propóleo en un 75% a partir de la concentración de 312.5 ug/ml, hallándose que hasta 625 ug/ml no hay crecimiento bacteriano; por tanto, la CMI se obtiene del promedio de ambos valores en los que no hay crecimiento bacteriano.

TABLA N° 06: Concentración mínima inhibitoria (ug/ml) de la Oxacilina frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

CMI	+	% +
1000	0	0%
500	0	0%
250	0	0%
125	0	0%
62.5	0	0%
31.25	0	0%
15.625	3	25%
7.8125	12	100%
3.90625	12	100%
1.953125	12	100%

CMI oxacilina = 19.5

Fuente: Anexo N° 06

En la tabla N° 06 se observa que las cepas de *Staphylococcus aureus* comienzan a crecer en la oxacilina en un 25% a partir de la concentración de 15.625 ug/ml, hallándose que hasta 31.25 ug/ml no hay crecimiento bacteriano; por tanto, la CMI se obtiene del promedio de ambos valores en los que no hay crecimiento bacteriano.

IV. DISCUSIÓN

Para determinar si el extracto etanólico de propóleo tiene eficacia antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* es necesario cumplir con dos requisitos: Que el promedio del halo de inhibición sea sensible (≥ 22 mm) y que haya ausencia de crecimiento bacteriano según la CMI. En el estudio, basados en las tablas N° 01 y N° 02, se obtuvo que el promedio del halo de inhibición de EEP a distintas concentraciones varía desde 8.46 mm hasta 28.50 mm, siendo SENSIBLE en concentraciones de 80% y 90%, por lo tanto ambas concentraciones serían consideradas como EFICACES. Además, como se observa en las tablas N° 05 y N° 06, la CMI del EEP es de 546.9 ug/ml, siendo este valor más alto que para la Oxacilina que inhibe el crecimiento bacteriano a 19.5 ug/ml.

Estos datos son contrarios a los mostrados por Popova M et al⁹, quienes a través de las muestras estudiadas de propóleo demostraron actividad contra *Staphylococcus aureus* con una CMI < 100 ug mL⁻¹. Así mismo, Da Cunha M. et al¹⁰ también encontraron que el EEGP inhibió significativamente el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* en concentraciones menores y que la CMI del EEP fue de 6.25 – 12.5 ug/ml. Según estos resultados, ambos autores consideraron que el tratamiento era eficaz sólo utilizando el valor de la CMI de cada EEP a distintas concentraciones; sin embargo en el presente trabajo se consideraron dos criterios para determinar si es eficaz o no, obteniendo que sí es eficaz pero a concentraciones de 80% y 90%, además que la CMI es mayor a la hallada por los autores antes mencionados.

Alves E. et al¹³ obtuvieron halos de inhibición comprendidos entre 8,3 y 23, 5 mm para *Staphylococcus aureus*, siendo resultados casi similares a los hallados en este trabajo, cuyos valores variaron entre 8.46 mm hasta 28.50 mm, demostrando su eficacia antibacteriana. Esta similitud de resultados demuestran que el extracto etanólico de propóleo es eficaz frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, pero a concentraciones más altas, y que la CMI también necesita ser alta para inhibir su crecimiento. Esta similitud de resultados demuestran que el extracto etanólico de propóleo es eficaz frente a cepas de *Staphylococcus aureus* pero a

concentraciones altas, y que la CMI también necesita ser alta para inhibir su crecimiento.

El propóleo es un material resinoso extremadamente complejo que es producido por abejas y resulta de una colección selectiva de exudados de varias especies de plantas, por lo que su composición química y su actividad farmacológica pueden variar ampliamente de región a región; así se ha informado que en el noreste de Brasil se han caracterizado 12 tipos de propóleo y en el extracto etanólico de propóleo rojo se identificaron un flavonoide (quercetina), una isoflavona (daidzeina) y un ácido fenólico (ácido ferúlico)²⁸. Los extractos etanólicos de propóleo de Grecia y Este de Cyprus mostraron alto contenido de terpenos y/o flavonoides, antraquinonas y bajas cantidades de ácidos fenólicos; se afirma que la actividad antimicrobiana es principalmente debida a flavonoides, terpenos, ácidos fenólicos y sus ésteres y se considera que en combinación tienen efecto sinérgico²⁹.

Se han reportado algunos componentes del extracto etanólico de propóleo relacionados con la actividad contra *Staphylococcus aureus*, tal como los flavonoides galangina y pinocembrina, así como los derivados de ácidos benzoicos, ferúlico y cafeico; que le confieren un efecto antibacteriano sobre gérmenes grampositivos como el estafilococo dorado^{7,8}. El tetradecanal, γ -palmitolactona y etilhidrocinamato mostraron una fuerte correlación positiva con la actividad antibacteriana contra *S. aureus*³⁰. Con el propóleo colectado en Santiago de Estero, Argentina, se encontró correlación significativa entre el contenido de polifenoles y flavonoides totales con la actividad contra *S. aureus*, la más alta actividad antimicrobiana se observó con muestras con alto contenido de pinocembrina, uno de los más efectivos flavonoides contra bacterias, la actividad antimicrobiana correlacionó mejor con el contenido de pinocembrina que con el contenido de polifenoles totales³¹. También las flavanonas inhibieron el crecimiento de *S. aureus* y por lo tanto contribuyen a los efectos antibacterianos del extracto etanólico de propóleo australiano³².

Se concluye que el extracto etanólico de propóleo es eficaz frente a *Staphylococcus aureus*.

V. CONCLUSIONES

- El Extracto etanólico de propóleo muestra eficacia antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 80% y 90%.
- Existe diferencia altamente significativa ($p < 0,05$) entre el extracto etanólico de propóleo a diferentes concentraciones y oxacilina; siendo el mejor tratamiento la oxacilina y el EEP al 80% y 90%.
- La CMI del extracto etanólico de propóleo es de 546.9 ug/ml
- La CMI de Oxacilina es de 19.5 ug/ml

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar otros tipos de preparados de propóleo para comparar con el extracto etanólico y determinar la efectividad de los diversos extractos o aceites, así como la variedad de su actividad antimicrobiana.
- Aislar los principios activos causantes de la actividad antimicrobiana de propóleo.
- Realizar pruebas in vivo para valorar la efectividad y la toxicidad que puedan proporcionar los componentes activos de propóleo, así como la dosis terapéutica para la población humana.

VII. REFERENCIAS

1. Programa nacional de medicina complementaria – EsSalud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Manual de Fitoterapia. Perú, 2001. (Citado: 01-03-16. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/fitoterapia.html>)
2. Duke J, Bogenschutz M, Duke P. Medicinal Herbs. 2nd edition. CRC Press. USA, 2002. (Citado: 01-03-16. Disponible en: <http://www.prepperlinks.net/uploads/9/0/4/0/9040002/handbookofmedicinalherbs.pdf>)
3. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison Principios de medicina interna. 18ª edición. McGrawHill. México, 2012.
4. Jamison D, Breman J, Measham A, Alleyne G, Claeson M, Evans D. et al. Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd edition. New York: Oxford University Press and The World Bank. USA, 2006. P. 1091 – 1108. (Citado: 03-11-15. Disponible en: <http://www.who.int/surgery/challenges/disease-control-priorities.pdf>)
5. Ministerio de salud. Oficina general de Tecnología de la información. Boletín estadístico del Seguro Integral de Salud Enero – Junio 2015. Julio, 2015. (Citado: 02-11-15. Disponible en: <http://www.sis.gob.pe/Portal/estadisticas/index.html>)
6. Ministerio de salud. Indicadores trazadores. Morbilidad de consulta externa por grupos de edad al 30 de Junio del 2015. Perú, 2015. (Citado: 02-11-15. Disponible en: http://www.app.minsa.gob.pe/bsc/detalle_indbsc.asp?lcind=5&lcobj=1&lcper=1&lcfreg=13/10/2015)
7. Noriega V, Rodríguez E. El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. España, 2012. (Citado: 01-03-16. Disponible en: <http://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/5580/NoriegaSalmonV.pdf?sequence=1>)
8. Sammataro D. The beekeepers's Handbook. Cornell University Press. USA, 1998. (Citado: 01-03-16. Disponible en:

https://books.google.com.pe/books?id=ZLLB2fh55aQC&dq=propolis&source=gbs_navlinks_s)

9. Popova M, Dimitrova R, Talib H, Tsvetkova I, Najdenski H, Bandkova V. Omani propolis: Chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. Bulgaria, 2013. Chemistry Cent Jour 2013, 7:158. (Citado: 14-04-15. Disponible en: <http://journal.chemistrycentral.com/content/7/1/158>)
10. Da Cunha M, Franchin M, Camara L, Tasca A, Carvalho J, Ikegaki M. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. BMC Compl and Alt Med 2013, 13:23. (Citado: 16-04-15. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/23>)
11. Monzote L, Cuesta O, Campo M, Márquez I, Fraga J, Pérez K. et al. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. Brasil, 2012. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 107(8): 978-984. (Citado: 15-04-15. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23295746>)
12. Carrillo M, Castillo L, Mauricio R. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). México, 2011. Vol 22(5), 21-28 (2011). (Citado: 16-04-15. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642011000500004&script=sci_arttext)
13. Alves E, Guzman D, Figueroa J, Tello J, Oliveira D. Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: apidae) de la región andina de Colombia. Acta biol. Colomb., Vol. 16 N.º 1, 2011 175 – 184. (Citado: 16-04-15. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2011000100013)
14. Brooks G, Butel J, Ornston L. et al. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 14va edición. Manual moderno. México, 1992. Pgs. 207-212
15. Murray M, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica. 6ta edición. Elsevier. España, 2009. Pgs. 209-222
16. Ronald A. Frutoterapia, nutrición y salud. Edaf, España, 2011.
17. Mendizabal F. Manuales escenciales. Editorial Albatros, 2005. Pags. 65-66
18. Ara A, Roldán A, Los grandes remedios naturales. Vol. 130 de Vida Natural. EDAF, 2003. Pags. 79-81

19. Prost J. Apicultura: conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena. Mundi Prensa Libros, 2007. Pags. 508-510
20. Callejas P. Obtención de extractos de plantas en medios ácidos y/o alcohólicos para aplicaciones medicinales y alimenticias. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Manizales. 2002
21. Ministerio de salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Instituto nacional de salud. Serie de normas técnicas N°30. Lima, 2002.
22. Clinical and laboratory standards institute. M100 – S25. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty – fourth information supplement. USA, 2015. (Citado: 01-06-16. Disponible en: http://ncipd.org/control/images/NCIPD_docs/CLSI_M100-S25.pdf)
23. Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL. McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using Mycobacterium tuberculosis as a research tool. Med.Assoc. 14:1176, 1907. 51. (Citado: 01-03-16. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X1999000900003)
24. Picazo J, García J, Cantón R, et al. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. España, 2011 (Citado: 01-03-16. Disponible en: http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf)
25. Simark-Mattsson C, Emilson C-G, et al. Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. Eur J Oral Sci. 2007; 115: 308–14
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards Document. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 4th ed. 10:7, 2012.
27. Barrientos A, Cabrejos G, Casquero J, Collantes H, Córdova R, Obregón G. et al. Norma técnica de Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. Ministerio de salud. Perú, 2005. (Citado: 20-09-15. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/0/jer/-1/Manual%20de%20bioseguridad%20-%20INS.pdf>)

28. Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JA, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;113:278–283.
29. Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinou I, Karathanos VT. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry* 2009;116:452–461.
30. Bittencourt ML, Ribeiro PR, Franco RL, Hilhorst HW, de Castro RD, Fernandez LG. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Research International* 2015;76:449–457.
31. Chaillou LL, Nazareno MA. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology* 2009;42:1422–1427.
32. Massaro CF, Katouli M, Grkovic T, Vu H, Quinn RJ, Heard TA, et al. Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae). *Fitoterapia* 2014;95: 247–257

VIII. ANEXOS

ANEXO N°01

FICHA PARA RECOLECCIÓN DE DATOS N° _____

“EFICACIA ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*”

I. DATOS GENERALES:

- **FECHA:** / /
- **HORA:**
- **CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO:**

II. DATOS DE LA VARIABLE DEPENDIENTE: EFICACIA ANTIMICROBIANA

SÍ () NO ()

III. DATOS DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE: TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO CON PROPÓLEO

SÍ () NO: OXACILINA ()
AGUA ESTÉRIL ()

**ANEXO N°02: RECOLECCIÓN DE DATOS DE EFICACIA ANTIMICROBIANA IN
VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO SOBRE CEPAS DE
Staphylococcus aureus.**

N° DE REPETICIONES	Halo de inhibición (mm)				
	EEP al 90 %	EEP al 80%	EEP al 70%	EEP al 60%	OXACILINA
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					

ANEXO N° 04: RESULTADOS DEL HALO DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y DE OXACILINA

N° REPETICIONES	HALO DE INHIBICIÓN (MM)				HALO INH. (MM)
	a-90%	b-80%	c-70%	d-60%	OXACILINA
1	27	28	15	9	32
2	28	29	18	9	32
3	30	28	18	10	32
4	27	27	18	8	31
5	28	28	19	8	31
6	28	28	18	9	31
7	28	27	18	7	32
8	27	27	18	9	32
9	27	27	15	7	32
10	30	28	18	9	33
11	28	28	15	10	33
12	29	27	17	9	33
13	29	27	18	7	33
14	30	27	18	7	33
15	28	27	17	10	33
16	27	27	17	9	33
17	29	28	16	8	33
18	28	28	16	10	33
19	30	27	16	9	32
20	30	28	16	9	32
21	30	27	17	7	32
22	30	28	16	7	32
23	27	27	19	7	32
24	29	28	17	9	32

Fuente: Datos de laboratorio

**ANEXO N° 05: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (UG/ML) DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO FRENTE A CEPAS DE
*Staphylococcus aureus***

Nº	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (µG/ML)									
	10000	5000	2500	1250	625	313	156.25	78.13	39.06	19.53
1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Fuente: Datos de laboratorio

**Anexo N° 06: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (UG/ML) DE LA
OXACILINA FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus***

Nº	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (µG/ML)									
REPETICIONE	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95
S										
1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Fuente: Datos de laboratorio